

# Maladie de Kaincopé : présence de mycoplasmes dans le phloème des cocotiers malades

M. DOLLET (1), J. GIANNOTTI (2)

avec la collaboration technique de M<sup>lle</sup> CZARNECKY (2)

**Résumé.** — Une étude cytologique en microscopie électronique, sur des fragments d'inflorescences de cocotiers atteints de la maladie de Kaincopé, a été entreprise. Dans les coupes ultrafines, des éléments sphériques et ovoïdes à membrane trilamellaire qui correspondent à des germes de type mycoplasme ont été observés. La généralisation de cette étude aux maladies à jaunissement présentant de nombreuses analogies avec la maladie de Kaincopé en Afrique et en Amérique est envisagée.

**Mots clés :** Cocotier, Inflorescences, Maladie de Kaincopé, Microscopie électronique, Cellules libériennes, Mycoplasme.

Parmi les maladies d'importance économique qui posent encore le problème de leur étiologie, figurent les jaunissements affectant les cocotiers dans certains pays de l'Afrique de l'Ouest : Maladie de Kribi au Cameroun, « Akwa disease » au Nigeria, « Cap St-Paul wilt » au Ghana et maladie de Kaincopé au Togo. Cette dernière maladie, dont les premières études remontent à 1948 [Meiffren] a fait, depuis, l'objet de nombreuses recherches, et en 1958 Bachy et Hoestra lui attribuent un « pouvoir contagieux élevé ». L'hypothèse d'un virus était avancée. Mais jusqu'à présent, ni champignons, ni bactéries, ni virus, ni mycoplasmes n'ont pu être décelés dans les tissus de cocotiers malades [Maramorosch et Hirumi, 1973].

En 1975, Giannotti *et al.* ont tenté une approche par des essais de primo-cultures *in vitro* de germes susceptibles de se développer dans les tissus profonds de plantes malades, et par des études cytochimiques de mise en évidence de l'ADN. Des cultures de mycoplasmes ont été obtenues avec les cocotiers malades uniquement, tandis qu'au niveau du phloème, des cellules criblées présentaient des éléments Feulgen positifs.

De son côté, Steiner obtient une rémission partielle de la maladie de Kaincopé sur des arbres traités à la tétracycline.

Pour préciser la nature et la localisation exacte des germes suspectés d'être présents dans les plantes malades, nous avons entrepris des observations en microscopie électronique.

## I. — PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Au cours d'une mission en avril 1975 au Togo [Dollet et Arnaud, 1975], des cocotiers situés dans un nouveau foyer de maladie en pleine expansion situé près d'Atoueta et présentant des symptômes typiques (jaunissement des feuilles, chute de noix immatures, inflorescences nécrosées) ainsi que des cocotiers sains situés en zone non contaminée, ont fait l'objet de prélèvements au niveau d'inflorescences encore enfermées dans leur spathe, et ne manifestant à l'ouverture de la gaine aucun désordre marqué (Fig. 1). Les pièces excisées, de petite taille, sont fixées sur le terrain dans du glutaraldéhyde à 4 p. 100 tamponné à pH 7,2 par du cacodylate de sodium 0,1 M pendant cinq heures



FIG. 1. — Type d'inflorescences de cocotiers ayant servi au prélèvement d'échantillons pour la microscopie électronique. (Type of coconut inflorescence from which samples were taken for electron microscopy.)

dans un container en polystyrène contenant de la glace. Ces pièces ont été ensuite conservées dans du tampon cacodylate de sodium pendant 17 h entre 4 et 10 °C. La suite des opérations s'effectue en laboratoire, elles comprennent plusieurs rinçages prolongés dans le tampon seul, une post-fixation de 2 h dans une solution de tétroxyde d'osmium à 1 p. 100 tamponnée à pH 7,2. Après déshydratation dans un gradient d'acétone, le matériel est inclus dans de l'épon.

Le repérage des faisceaux libéro-ligneux, orientés longitudinalement, s'effectue sur des coupes semi-fines de 1 micron d'épaisseur. Puis les coupes ultra-fines sont contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb et examinées avec un microscope électronique Hitachi HU 11 CS.

## II. — RÉSULTATS

Dans les coupes ultra-fines, certaines cellules libériennes montrent, principalement au niveau de leurs cribles, des éléments sphériques, ovoïdes, parfois allongés. Leur taille est variable, mais paraît se situer pour les formes les plus régulières entre 0,3 et 0,9  $\mu$ . Leur structure interne comprend des granules ribosomiaux de petite taille et des fibrilles nucléaires d'ADN. A fort grossissement leur enveloppe se résout à une membrane tripartite ayant l'épaisseur et la structure d'une membrane unitaire (Fig. 2 et 3).

(1) I. R. H. O. Station de recherches de Cytopathologie, 30380 St-Christol-les-Alès (France).

(2) I. N. R. A. Station de recherches de Cytopathologie, 30380 St-Christol-les-Alès (France).



FIG. 2. — Microorganismes de type mycoplasme (M) au niveau de la paroi criblée (PC) séparant deux cellules libériennes de cocotier malade.  
(*Mycoplasma-type microorganisms (M) at the level of the screened wall (PC) between two phloem cells in a diseased coconut.*)  
P = pore, F = filaments de protéine P (*P protein filaments*) ( $\times 34\ 800$ , photographie réduite de moitié — *Photo reduced by half*).

Les éléments ayant ces caractéristiques correspondent donc à des micro-organismes ayant la morphologie, la structure et la taille des germes de type mycoplasme. En général, les cellules parasitées correspondent à des éléments fonctionnels évolués dans lesquels le cytoplasme est réduit à une mince couche pariétale, et parfois même à la seule membrane plasmique, les cribles étant nettement déjà ouverts.

Les coupes ultra-fines effectuées dans les échantillons provenant de sujets sains, ne révèlent, dans aucun type de cellules, la présence d'éléments semblables à ceux décrits plus haut, ou appartenant à d'autres types de micro-organismes.

### III. — DISCUSSION

Les observations que nous venons d'exposer confirment nos travaux précédents et montrent que les cocotiers atteints de la maladie de Kaincopé sont bien parasités par des germes de nature mycoplasmaïque. Il s'agit donc d'une maladie infectieuse, comme les jaunisses affectant de nombreuses plantes herbacées ligneuses et arbres. Cependant, les greffages étant inopérants chez les monocotylédones, les plantes parasites vectrices ne paraissant pas se fixer sur les cocotiers, et aucun insecte vecteur n'étant connu pour ce groupe de maladies, les germes ne peuvent être retransmis expérimentalement.

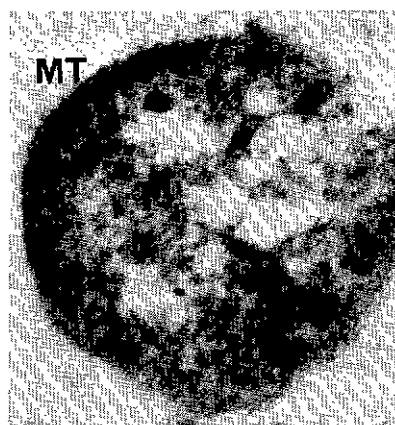


FIG. 3. — Membrane tripartite (MT) d'un germe de type mycoplasme observé dans un tube criblé ( $\times 85\ 500$ ).  
(*Tripartite membrane (MT) of a mycoplasma-type germ observed in a sieve tube.*)

D'autre part, le petit nombre de germes observés contraste avec les observations habituelles effectuées sur du matériel herbacé ou des arbrisseaux comme *Vinca rosea* mais rappelle certaines situations déjà enregistrées comme par exemple le cas de la rosette du pêcher [Kirkpatrick *et al.*, 1975].

Les observations de germes mycoplasmaïques permettent d'autre part de rapprocher la maladie de Kaincopé du jaunissement mortel du cocotier qui sévit à la Jamaïque et en Floride [Plavysic-Banjac *et al.*, 1972 ; Beakbane *et al.*, 1972 ; Parthasarathy, 1973].

Nos observations renforcent ainsi l'opinion d'Ollagnier et Weststeijn [1961] qui rapprochaient la maladie de Kaincopé et le jaunissement mortel sur la base d'observations d'analogies de symptômes et de comportement des cocotiers malades.

Cette orientation, qui guidait déjà nos recherches, est maintenant élargie à d'autres maladies du même genre qui affectent le cocotier. Une mission effectuée au Cameroun en 1975 [Renard, Dollet, 1975] nous a permis de commencer les premières recherches sur la maladie de Kribi, et des échantillons de cocotiers malades du Ghana dernièrement reçus permettront bientôt de compléter notre étude sur les jaunissements du cocotier.

**Remerciements.** — Nous tenons à remercier le Dr Steiner pour son aide amicale lors de notre mission au Togo.

### BIBLIOGRAPHIE

- BACHY A. et HOESTRA H. (1958). — Contribution à l'étude de la « maladie de Kaincopé » du cocotier au Togo. *Oléagineux*, 13, p. 721-730.
- BERYL BEAKBANE A., SLATER C. H. W. et POSNETTE A. (1972). — Mycoplasmas in the phloem of coconut, *Cocos nucifera* L. with lethal yellowing disease. *J. hort. Sci.* 47, 265.
- DOLLET M. et ARNAUD F. — Rapport de mission effectuée au Togo du 21 au 25 avril 1975 sur la maladie de Kaincopé, 8 p. (document I. R. H. O. non publié).
- GIANNOTTI J., ARNAUD F., DOLLET M., DELATTRE R. et G. de TAFFIN (1975). — Mise en culture de mycoplasmes à partir de racines et d'inflorescences de cocotiers atteints par la maladie de Kaincopé. *Oléagineux*, 30, 1, p. 13-18.
- KIRKPATRICK H. C., LOWE S. K. et NYLAND G. (1975). — Peach rosette : the morphology of an associated mycoplasma-like organism and the chemotherapy of the disease, *Phytopathology*, 65, p. 864-870.
- MARAMOROSCH K. et HIRUMI H. (1973). — Phytoferritin accumulations in leaves of diseased coconut palms, *Proto-plasma*, 78, p. 175-180.
- MEIFFREN M. (1948). — Les maladies du cocotier. *Rapport annuel S. C. R. A.*, Bingerville.
- OLLAGNIER M. et WESTSTEIJN G. (1961). — Les maladies du cocotier aux Iles Caraïbes. Comparaison avec la maladie de Kaincopé au Togo. *Oléagineux*, 16, p. 729-736.
- PARTHASARATHY M. V. (1973). — Mycoplasma-like organisms in the phloem of palms in Florida affected by lethal yellowing. *Plant Dis. Rep.*, 57, p. 861-862.
- PLAVYSIC-BANJAL B., HUNT P. et MARAMOROSCH K. (1972). — Mycoplasma-like bodies associated with lethal yellowing disease of coconut palms. *Phytopathology*, 62, p. 298-299.
- RENARD J. L. et DOLLET M. (1975). — Perspectives nouvelles d'étude de la maladie de Kribi. Document I. R. H. O. n° 1227, 17 p.
- STEINER K. G. — Studies on the Kaincopé disease of coconut palms in Togo. Fourth session of the technical working Party on coconut Production, Protection and Processing. Kingston, Jamaica 14-25 September 1975.

## SUMMARY

**Kaincope Disease : Presence of Mycoplasma in the Phloem of Diseased Coconuts.**

M. DOLLET and J. GIANNOTTI, *Oléagineux*, 1976, **31**, N° 4, p. 169-171.

A cytological study by electron microscopy was undertaken, on fragments of coconut inflorescences infected with Kaincope disease. In the ultra-thin sections, spherical and ovoid elements with a trilamellate membrane, which correspond to germs of the mycoplasma type, were observed. It is planned to extend this study to the yellowing diseases in Africa and America which have many similarities with Kaincope disease.

## RESUMEN

**Enfermedad de Kaincopé, presencia de micoplasmas en el floema de cocoteros enfermos.**

M. DOLLET y J. GIANNOTTI, *Oléagineux*, 1976, **31**, N° 4, p. 169-171.

Se emprendió un estudio citológico en microscopía electrónica, sobre fragmentos de inflorescencias de cocoteros con ataque de enfermedad de Kaincopé. En los cortes ultrafinos se observó elementos esféricos y ovoides de membrana trilaminar que corresponden a gérmenes de tipo micoplasma. Se proyecta la generalización de este estudio a las enfermedades de amarilleo que presentan muchas analogías con la enfermedad de Kaincopé en África y en América.



## Kaincope Disease : Presence of Mycoplasma in the Phloem of Diseased Coconuts

M. DOLLET (1), J. GIANNOTTI (2)

With the technical collaboration of Miss CZARNECKY (2)

Amongst the diseases of economic importance whose etiology is still a problem are the yellowings affecting coconuts in certain West African countries : Kribi disease in Cameroon, « Akwa disease » in Nigeria, Cape St. Paul Wilt in Ghana, and Kaincope disease in Togo. First studied in 1948 [Meiffren], the last-named has since been the object of a great deal of research, and in 1958 Bachy and Hoestra attributed a « high power of contagion » to it. The hypothesis of a virus was put forward. But up to now no fungi, no bacteria, no viruses, no mycoplasma have ever been brought to light in the tissues of diseased coconuts [Maramorosch and Hirumi, 1973].

In 1975, Giannotti *et al.* tried an approach by tests of primocultures *in vitro* of germs likely to develop in the deep tissues of diseased plants and by cytochemical studies to show DNA. Mycoplasma cultures were obtained only from diseased coconuts, in which the screened cells presented positive Feulgen elements at the phloem level.

For his part, Steiner obtains partial remission of Kaincope disease on trees treated with tetracycline.

To specify the nature and exact location of the germs suspected of being present in the diseased plants, observations were carried out by electron microscopy.

### I. — PREPARATION OF SAMPLES

In the course of a mission to Togo in April 1975 [Dollet and Arnaud, 1975], coconuts growing in a new focus of disease in full expansion near Atoueta and showing typical symptoms (yellowing of the leaves, premature nut-drop, decayed inflorescences), as well as healthy coconuts in an uncontaminated zone, were sampled at the level of inflorescences still enclosed in the spathe and showing no marked signs of damage when the sheath was opened (Fig. 1). The small fragments excised were fixed straight away in the field in glutaraldehyde at 4 p. 100 neutralized to pH 7.2 by sodium cacodylate 0.1 M for five hours in a polystyrene container with ice. These fragments were then kept in neutral sodium cacodylate for 17 hours between 4 and 10 °C. The rest of the operations were carried out in the laboratory and include several prolonged rinsings in the neutral solution alone, 2 hours post-fixation in a solution of osmium tetroxide at 1 p. 100 neutralized to pH 7.2. After dehydration in an acetone gradient, the material is included in the epon.

Detection of the longitudinal wood-and-bast bundles is carried out on semi-fine sections 1 µ thick. Then ultra-fine sections are contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined under a Hitachi HU 11 CS electron microscope.

### II. — RESULTS

In the ultra-thin sections certain phloem cells show spherical, ovoid, sometimes elongated elements, mainly at the level of their sieve tubes. Their size is variable, but for the most regular forms appears to be between 0.3 and 0.9 microns.

Their internal structure comprises small-sized ribosomal granules and nuclear fibrilla of DNA. At a high magnification their envelope resolves into a tripartite membrane having the thickness and structure of a unit membrane (Fig. 2 and 3).

The elements with these characteristics correspond, therefore, to micro-organisms with the morphology, structure and size of germs of the mycoplasma type. In general the infected cells corresponded to developed, functional elements in which the cytoplasm is reduced to a thin, parietal layer, and sometimes even to the plasmic membrane alone, the sieve tubes being already wide open.

The ultra-fine sections made in the samples from healthy plants do not show, in any type of cell, elements similar to those described above or any other micro-organisms.

### III. — DISCUSSION

The observations which we have just described confirm our previous research and show that coconuts infected with Kaincope disease are indeed infected by germs of a mycoplasmic nature. Thus, the infectious disease described here is similar to the yellows affecting numerous herbaceous and ligneous plants and trees. However, as it is not possible to graft on monocotyledons, the parasitism vector plants do not seem to fix themselves on the coconuts, and as no insect vector of this type of disease is known, the germs cannot be transmitted experimentally.

Furthermore, the small number of germs observed contrasts with the usual observations made on herbaceous material or bushes like *Vinea rosea*, but recalls certain situations already recorded such as rosette disease of the peach, for example [Kirkpatrick *et al.*, 1975].

The observations of mycoplasmic germs, moreover, allow a parallel to be drawn between Kaincope disease and Lethal Yellowing of the coconut which is found in Jamaica and Florida [Plavsic-Banjac *et al.*, 1972 ; Beakbane *et al.*, 1972 ; Parthasarathy, 1973].

Thus, our observations confirm the opinion of Ollagnier and Weststeijn [1961], who connected Kaincope disease with Lethal Yellowing on the basis of similarities between the symptoms and the behaviour of the diseased palms.

This orientation, which already guided our research, has now been widened to other coconut diseases of the same type.

A mission to Cameroon in 1975 [Dollet, Renard, 1975] enabled us to start research on Kribi disease, and the samples of diseased palms received from Ghana recently will allow us to complete our study of coconut yellowings in the near future.

**Acknowledgements.** — We would like to thank Dr. Steiner for his kind help during our mission to Togo.

(1) I. R. H. O. Cytopathology Research Station, 30380 St-Christol-les-Alès (France).

(2) I. N. R. A. Cytopathology Research Station, 30380 St-Christol-les-Alès (France).